10.22092/sppi.2020.123483

"مجله نهال و بذر"
جلد ۳۶، شماره ۳، سال ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

اثر متابولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده

Effect of Metabolites and Antioxidants on Freezing Tolerance of Lentil Genotypes Under Controlled Conditions

جعفر نباتی[1]، احمد نظامی[2]، سیده محبوبه میرمیران[3]، سید سعید حجت[4] و محمد کافی[5]

۱- استادیار، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران ایران.
۴- کارشناس، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۵-استاد، گروه آگروتکنولوژی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۵

چکیده

نباتی، ج.، نظامی، ا.، میرمیران، س. م.، حجت، س. س. و کافی. م. ۱۳۹۹. اثر متابولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده. **مجله نهال و بذر ۳۶: ۲۹۹-۲۷۳**.

این مطالعه جهت به‌گزینی تحمل به یخ‌زدگی (۱۳-، ۱۵- و ۱۸- درجه‌سانتیگراد) ۴۰ ژنوتیپ عدس به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت شرایط کنترل‌شده در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه ازنظر درصد بقا بعد از تنش یخ‌زدگی و محتوای کلروفیل a، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، فنل، پروتئین، DPPH، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز قبل‌از تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مدل رگرسیونی نشان داد که کلروفیل b بیشترین تأثیر مثبت و پروتئین و مالون‌دی‌آلدئید بیشترین تأثیر منفی را بر درصدبقا داشتند. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تفکیک کرد. برای بیشتر صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های گروه چهارم و پنجم نسبت به میانگین کل و ژنوتیپ‌های سایر گروه‌ها برتری داشتند. در گروه چهارم محتوای آنتوسیانین، پروتئین، مالون‌دی‌آلدئید، فنل، پرولین، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز نسبت به میانگین کل و سایر گروه‌ها برتری داشت. درصدبقا، محتوای کلروفیلb، کاروتنوئیدها، کل رنگ‌دانه‌ها و DPPH گروه پنجم نسبت به سایر گروه‌ها برتر بودند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ژنوتیپ‌های MLC469، MLC458، MLC409، MLC74، MLC84، MLC169، MLC394، MLC95، MLC17، MLC163 و MLC303 ازنظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌ها و ژنوتیپ‌های MLC70، MLC410، MLC47، MLC31، MLC91، MLC8، MLC286، MLC407 و MLC472، MLC61، MLC83 و MLC334 ازنظر ظرفیت رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی از وضعیت مطلوبی برخوردار هستند. به‌طورکلی، به‌نظر می‌رسد این شاخص‌ها قبل از وقوع تنش سرما اهمیت زیادی در پیش‌بینی تأثیر سرما بر درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس دارند.

واژه‌های کلیدی: عدس، درصد بقا، پرولین، رنگ‌دانه، آنتوسیانین

نگارنده مسئول: jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۹۹۶

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik.) ازجمله مهم‌ترین گیاهان زراعی دیم به‌ویژه در منطقه خاورمیانه محسوب می‌شود. چهار کشور عمده تولیدکننده عدس هند، کانادا، ترکیه و ایران می‌باشند (FAO, 2017). این گیاه به علت محتوای پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌های ارزشمند در دانه و کاه و کلش، به‌عنوان خوراک انسان و تعلیف دام به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه مورداستفاده قرار می‌گیرد (Thavarajah *et al.,* 2017).

بر اساس آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو) در سال ۲۰۱۷، سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۳۸/۷هزار هکتار و میزان عملکرد عدس حدود ۶۰۰ کیلوگرم در هکتار بود (FAO, 2017). پایین بودن و عدم پایداری عملکرد این محصول را می‌توان ناشی از شیوه‌های مدیریتی ناکارآمد و پتانسیل پایین عملکرد ارقام و توده‌های محلی دانست که با به‌کارگیری و بهبود شیوه‌های مدیریتی ازجمله تغییر در تاریخ کاشت می‌توان نسبت به رفع آن اقدام نمود.

کاشت عدس معمولاً در اواخر فصل زمستان و اوایل فصل بهار و به‌صورت دیم انجام می‌شود. کشت گیاهان در بهار سبب مواجه‌شدن آن‌ها با گرما و خشکی در طول فصل رشد شده و انجام آبیاری جهت حصول عملکرد مناسب ضروری می‌باشد. بااین‌وجود کمبود آب در اغلب مناطق کشور سبب کاهش تولید گیاهان می‌شود. کاشت زمستانه عدس یک روش مدیریتی مناسب جهت بهبود عملکرد محسوب می‌شود. این کشت شرایط مناسبی را جهت استفاده بهتر و مؤثرتر از نزولات جوی زمستانه فراهم کرده (Barrios *et al.,* 2016) و همچنین از برخورد گیاه با گرما و خشکی در انتهای فصل ممانعت می‌کند.

علی‌رغم مزایای کشت پاییزه، مرگ گیاهان به‌عنوان یک معضل در این کشت محسوب شده (Homer *et al*., 2016) و توانایی نمو، رشد مجدد (Caverzan *et al.,* 2016) و تولید محصولات زراعی به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های نامطلوب محیطی ازجمله تنش سرما قرار می‌گیرد (Rahaie *et al.,*2013). مطالعات پیشین در ایران حاکی از وجود ژنوتیپ‌های متحمل به سرما با درصد بقا و عملکرد مناسب در کشت پاییزه است (Bagheri, *et al*., 2004; Gholami Rezvani *et al*., 2019).

به همین دلیل در بررسی تحمل به یخ‌زدگی، بقای گیاهان پس از وقوع یخ‌زدگی به‌عنوان معیار ارزیابی جهت تحمل گیاهان به دماهای یخ‌زدگی موردبررسی قرار می‌گیرد. گیاهان کشت پاییزه در بخشی از دوران رشد رویشی خود با شرایط سرما مواجه می‌شوند که برخی سال‌ها، وقوع سرمای شدید ممکن است آسیب‌های جبران‌ناپذیری به گیاه وارد کرده و در بعضی موارد حتی منجر به مرگ گیاه شود (Valizadeh Kamran *et al.,* 2015)، بنابراین شناسایی ارقام متحمل به یخ‌زدگی عدس جهت

کشت در این نواحی امری ضروری می‌باشد (Barrios *et al.,*2016).

مواجه‌شدن گیاه با تنش یخزدگی سبب کاهش میزان کلروفیل برگ، پژمردگی، کلروز و ایجاد تغییرات متابولیکی از جمله کاهش در محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی (Miura and Furumoto, 2013) می‌شود. همچنین سبب اختلال در سیستم انتقال الکترون، کاهش کارایی کوانتومی فتوسیستم II، خسارت به فتوسیستم I، تغییر در چرخه احیای کربن و افزایش تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Saibo *et al.,* 2009). گیاهان در ساختارهایی مثل کلروپلاست و میتوکندری به‌طور مداوم گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species = ROS) را تولید می‌کنند. ولی این گونه‌ها به‌صورت پیوسته و به روش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی توسط سیستم دفاعی پیچیده گیاه، حذف می‌گردند (Pradedova *et al.,* 2011).

سازگاری به تنش سرما درنتیجه سازکارهای پیچیده بیوشیمیایی است که منجر به تجمع پروتئین‌های ضدیخ در آپوپلاست، افزایش قندهای محلول، آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز است (Ma *et al.*, 2010) که با افزایش سطح آن‌ها برای مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن احیایی سلول حفظ می‌شود. تغییر تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن سبب بروز تنش‌های اکسیداتیو در گیاه شده و از رشد و عملکرد گیاه ممانعت می‌نماید (Sharma *et al.*, 2012).

ارتباط بین افزایش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و مقاومت به سرما در گندم زمستانه (*Triticum asetivum* L.) گزارش شده است (Oakley *et al.,* 2018). پروتئین‌های ضد یخ طی فرآیند خوسرمایی در گیاه تجمع یافته و از مسیرهای گوناگون مانند کاهش دمای انجماد، تعدیل یا ممانعت از رشد بلورهای یخ، جلوگیری از تبلور مجدد و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از دماهای زیر صفر، از گیاه در مقابل سرما محافظت می‌کند (Duman and Wisnieski, 2014). ارتباط بین تجمع این پروتئین‌ها و مقاومت به تنش یخزدگی در گیاهان گزارش شده است (Balamurugan *et al.,* 2018). افزایش تجمع پروتئین‌ها در طی خوسرمایی سبب افزایش درصد بقا در گندم و جو (*Hordeum vulgare* L.) رشد یافته در مزرعه شد (Vitamvas *et al.,* 2019). خوسرمایی سبب افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول، کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در رقم مقاوم به سرمای گندم شد (Janmohammadi *et al.,* 2012).

نخستین آنزیمی که باگونه‌های فعال اکسیژن مقابله می‌کند، سوپراکسیددسموتاز است که به‌عنوان یک جزء بنیادی سیستم دفاع آنتی

اکسیدانی در گیاهان، مسئول تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن با سرعت بالا می‌باشد (Kim *et al.,* 2012). فعالیت آنزیم‌ها و تجمع کربوهیدرات‌ها همبستگی بالایی با سازگاری به سرما دارند. افزایش میزان کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم آن‌ها با فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز، جابجایی عناصر و تنفس نقش مهمی در تحمل به یخ‌زدگی در گیاهان بازی می‌کنند. همبستگی مثبت بین میزان کربوهیدرات‌ها و درجه تحمل به سرما در گیاهان مشاهده شده است (Winifield *et al.,* 2010).

تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها در طی خوسرمایی و نقش‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در جلوگیری از واکنش‌های اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش یخ‌زدگی در گیاهان گزارش شده است (Schulz *et al.,* 2016). به‌عبارتی حساسیت و یا تحمل گیاهان با پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در ارتباط است و گونه‌های گیاهی متحمل از طریق تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از ظرفیت بهتری برای محافظت گیاه در برابر تنش برخوردار هستند.

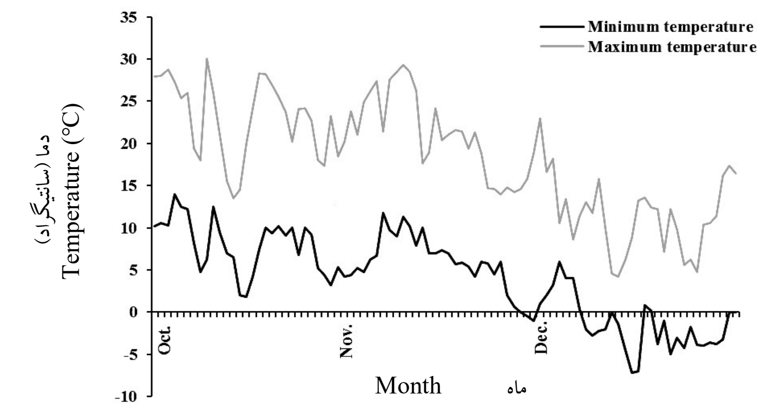
بنابراین جهت جلوگیری از مواجهه دوران رشد زایشی گیاه با کمبود آب در انتهای فصل رشد در کشت‌های معمول بهاره و بهره‌مندی از مزایای کشت پاییزه، این پژوهش با هدف به‌گزینی ژنوتیپ‌های منتخب عدس که از درصد بقا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب‌تری در مقابله با تنش یخ‌زدگی برخوردار هستند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل موردبررسی شامل ۴۰ ژنوتیپ منتخب عدس (Bagheri, *et al.*, 2004; Hojjat *et al.*, 2007; Hojjat and Galstyan, 2014; Gholami Rezvani *et al.*, 2019) و سه سطح دمای یخ‌زدگی شامل ۱۳-، ۱۵- و ۱۸- درجه سانتیگراد بودند.

در مهر ۱۳۹۶، بذر ژنوتیپ های عدس در عمق یک سانتیمتری گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتیمتر و ارتفاع ۱۱ سانتیمتر و حاوی ۲۵ درصد حجمی شن و ۷۵ درصد حجمی خاک مزرعه کشت شدند. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، تعداد ۱۰ بوته در هر گلدان نگهداری شد. گیاهان در شرایط طبیعی و در فضای آزاد رشد یافته و در معرض خوسرمایی قرار گرفتند. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار انجام شد و به‌منظور اعمال خوسرمایی گیاهان در شرایط طبیعی (شکل ۱) تا مرحله گیاهچه‌ای (حدود چهار تا شش برگی) رشد کردند.

گیاهان ۲۴ ساعت قبل از اعمال تنش یخ‌زدگی آبیاری شدند و سپس برای اعمال سطوح دماهای یخ‌زدگی در اواسط بهمن به



شکل ۱- تغییرات دماهای حداقل و حداکثر روزانه مشهد در پاییز ۱۳۹۶

Fig. 1. Daily minimum and maximum temperatures during fall season in 2017-2018, Mashhad, Iran

فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتیگراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش یافت. به‌منظور ایجاد هستک یخ در گیاه و اجتناب از بروز پدیده فراسرما، در دمای ۲- درجه سانتیگراد، پاشش باکتری‌های ایجاد کننده هستک یخ (Ice Nucleation Active Bacteria = INAB) روی گیاهان انجام شد (Wisniewski *et al.,* 2002). گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگهداری و سپس به مدت ۲۴ ساعت به اتاقک سرد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

با توجه به اینکه خوسرمایی یکی از مولفه‌های مهم در بهبود تحمل به سرما در کشت‌های پاییزه است و در گیاهان پاییزه خوسرمایی به صورت طبیعی انجام می‌گیرد (Hincha and Zuther, 2020)، بنابراین بعد از خوسرمایی و قبل از قرارگیری نمونه‌ها در معرض دماهای یخ‌زدگی صفاتی شامل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی (Dere *et al.,* 1998)، فعالیت مهارکننده رادیکال آزاد (DPPH) (Abe *et al*., 1998)، مالون دی‌آلدئید (Heath and Parker, 1968)، آنتوسیانین (Wanger, 1979)، فنل کل (Singleton and Rossi, 1965)، فلاونوئید (Chang *et al*., 2002)، کربوهیدرات‌های محلول (Dubois *et al.,* 1951)، پرولین (Bates *et al*., 1973)، پروتئین محلول (Bradford, 1976) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل آسکوربات پراکسیداز (Yamaguchi *et al.,* 1995) و پراکسیداز

(Sreenivasulu *et al.,* 1999) بررسی شدند.

جهت ارزیابی درصد بقا، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و پس از چهار هفته درصد بقا و وزن خشک آن‌ها تعیین شد. درصد بقا از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق رابطه ۱ محاسبه شد.

$$S = \frac{N_2}{N_1} \times 100$$ رابطه (۱)

در این رابطه S درصد بقا، N_1 تعداد گیاهان قبل از تیمار یخ‌زدگی و N_2 تعداد گیاهان زنده بعد چهار هفته از اعمال تیمار یخ‌زدگی می‌باشد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای برآورد همبستگی، تجزیه خوشه‌ای (بر اساس روش ward) و تجزیه رگرسیون گام به گام از نرم‌افزار JMP4 و برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم‌افزار STATISTICA8 استفاده شد.

نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های عدس موردمطالعه ازنظر غلظت کلروفیل a و کاروتنوئیدها قبل از تنش یخ‌زدگی تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۱). دامنه محتوای کلروفیل a در بین ژنوتیپ‌ها بین ۰/۳۰۲تا ۰/۷۵۵ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن تر متغیر بود و تفاوت ۶۰ درصدی بین بیشترین و کمترین غلظت کلروفیل a مشاهده شد. تنها ۲۳ درصد از ژنوتیپ‌های موردمطالعه از محتوای کلروفیل کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر برخوردار بودند. تفاوت ۷۱ درصدی نیز بین بیشترین (MLC91) و کمترین (MLC163) غلظت کاروتنوئیدها مشاهده شد. بیشترین محتوای کلروفیل a و کاروتنوئیدها متعلق به MLC91 بود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس برای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول و پرولین در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 1. Analysis of variance for photosynthesis pigments, anthocyanin, soluble carbohydrates and proline in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

منبع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	کلروفیل a Cha	کلروفیل b Chb	کاروتنوئیدها Carotenoids	کلروفیل a/b Cha/Chb	کل رنگ‌دانه‌ها Total pigment	آنتوسیانین Anthocyanin	کربوهیدرات‌های محلول Soluble carbohydrates	پرولین Proline
Genotype ژنوتیپ	39	0.031**	0.005	0.005**	0.154	0.064	0.046**	0.250**	0.956**
Error خطا	80	0.012	0.003	0.001	0.116	0.048	0.010	0.025	0.078
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)	-	19.3	17.4	20.9	19.3	20.4	21.7	19.7	22.3

**: Significant at the 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

Cha: Chlorophyll a, Chb: Chlorophyll b

جدول ۲- میزان کلروفیل a، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، کربوهیدارات‌های محلول و پرولین در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 2. Chlorophyll a, carotenoids, anthocyanin, soluble carbohydrates and proline content in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

ژنوتیپ Genotype	کلروفیل a (میلی گرم در گرم وزن تر) Cha (mg gfw^{-1})	کاروتنوئیدها (میلی گرم در گرم وزن تر) Carotenoids (mg gfw^{-1})	آنتوسیانین (میلی مول در گرم وزن تر) Anthocyanin (mmol gfw^{-1})	کربوهیدرات‌های محلول (میلی گرم در گرم وزن تر) Soluble carbohydrates (mg gfw^{-1})	پرولین (میلی گرم در گرم وزن تر) Proline (mg gfw^{-1})
MLC8	0.693ab	0.209a-f	0.590a-e	0.798c-k	0.921j-m
MLC9	0.391fg	0.105kl	0.382f-k	0.587i-k	0.973i-m
MLC11	0.625a-e	0.142g-k	0.675a-d	0.531jk	1.04h-m
MLC12	0.512b-g	0.155e-k	0.760a	0.593i-k	0.873j-m
MLC13	0.485b-g	0.107kl	0.556b-g	0.611h-k	0.857k-m
MLC16	0.615a-e	0.138g-k	0.334h-k	1.03b-e	0.785lm
MLC17	0.645a-d	0.161c-k	0.727ab	0.775d-k	0.864j-m
MLC22	0.496b-g	0.155e-k	0.358g-k	0.824c-k	0.793lm
MLC29	0.421e-g	0.113j-l	0.465e-j	0.739e-k	1.290f-l
MLC31	0.581a-f	0.162c-k	0.472e-j	1.420a	0.985h-m
MLC33	0.665a-d	0.224a-c	0.224k	0.631g-k	0.518m
MLC38	0.444d-g	0.104kl	0.388f-k	0.759e-k	0.887j-m
MLC47	0.604a-f	0.185b-i	0.434e-j	0.817c-k	0.929j-m
MLC55	0.503b-g	0.132h-l	0.372f-k	0.708f-k	0.929j-m
MLC61	0.629a-e	0.219a-d	0.570b-f	0.975b-f	1.540d-h
MLC70	0.596a-f	0.163c-k	0.510d-h	0.707f-k	1.690c-f
MLC71	0.302g	0.107kl	0.511d-h	0.224l	0.829k-m
MLC74	0.674a-c	0.193b-h	0.460e-j	0.808c-k	2.040cd
MLC81	0.580a-f	0.184b-i	0.290jk	0.897c-i	1.420f-j
MLC83	0.631a-e	0.186b-i	0.611a-e	0.849c-j	1.500e-i
MLC84	0.614a-e	0.196b-g	0.425e-j	0.827c-k	2.170bc
MLC91	0.755a	0.262a	0.446e-j	1.450a	0.889j-m
MLC95	0.582a-f	0.111j-l	0.357g-k	0.974b-f	2.010c-e
MLC103	0.391fg	0.112j-l	0.326h-k	0.793c-k	0.944j-m
MLC151	0.554a-f	0.147f-k	0.439e-j	1.10bc	1.010h-m
MLC163	0.632a-e	0.076l	0.456e-j	1.07b-d	0.761lm
MLC169	0.486b-g	0.125i-l	0.563b-f	0.922c-h	1.310f-l
MLC253	0.459c-g	0.136g-l	0.305i-k	0.529k	1.130g-l
MLC286	0.749a	0.236ab	0.504d-i	0.826c-k	1.290f-l
MLC303	0.558a-f	0.159d-k	0.320h-k	1.450a	0.908j-m
MLC334	0.638a-e	0.190b-h	0.709a-c	0.946c-g	1.090g-l
MLC337	0.501b-g	0.177b-i	0.411e-k	0.609h-k	1.620d-g
MLC394	0.506b-g	0.157d-k	0.496d-i	1.250ab	1.140f-l
MLC407	0.624a-e	0.174b-j	0.503d-i	0.743e-k	1.250f-l
MLC409	0.699ab	0.224a-c	0.521c-h	0.656g-k	1.520e-i
MLC410	0.606a-f	0.211a-e	0.285jk	0.599i-k	0.905j-m
MLC454	0.553a-f	0.158d-k	0.474e-j	0.710f-k	1.110g-l
MLC458	0.593a-f	0.183b-i	0.508d-h	0.935c-g	3.510a
MLC469	0.641a-e	0.155e-k	0.556b-g	0.561jk	2.540b
MLC472	0.701ab	0.195b-h	0.428e-j	0.718e-k	1.370f-k

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند برا ساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

Cha: Chlorophyll a

هرچند از لحاظ محتوای کلروفیل b، نسبت کلروفیل a به b و غلظت کل رنگیزه‌های فتوسنتزی بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه تفاوتی وجود نداشت، اما همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای کلروفیل b و کل رنگیزه‌های فتوسنتزی با درصد بقا مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴). در میان رنگیزه‌های فتوسنتزی، کلروفیل b بیشترین سهم را در حفظ بقای بالاتر به خود اختصاص داد. در کلروپلاست‌ها الکترون حاصل تجزیه آب در لومن به $NADP^+$ در استروما انتقال می‌یابد که حاصل این فرایند انجام فتوسنتز است. علاوه بر این مسیر اصلی، بر اساس اندازه‌گیری‌های عملکردی، مسیرهای انتقال الکترون جایگزین، شامل احیای غیر فتوشیمیایی یا اکسیداسیون پلاستوکینون‌ها در مصرف، دهنده‌ها یا پذیرنده‌های الکترون نیز گزارش شده است (Johnson, 2005).

در شرایط تنش سرما واکنش‌های شیمیایی جهت دریافت و انتقال الکترون به‌شدت کاهش می‌یابد وجود الکترون آزاد موجب خسارت‌های اکسیدانتی در قسمت‌های مختلف دستگاه فتوسنتزی خواهد شد. در این راستا وجود رنگ‌دانه‌های کمکی مانند کلروفیل b که وظیفه حافظتی دارند گیاه را قادر می‌سازد تا در شرایطی که امکان استفاده از الکترون‌ها موجود نیست با کاهش میزان الکترون آزاد موجب افزایش تحمل گیاه به تنش یخ‌زدگی گردد (Paredes and Quiles, 2015). به‌نظر می‌رسد این شاخص تاحدی می‌تواند برای تفکیک ژنوتیپ‌های حساس از متحمل در شرایط تنش مورداستفاده قرار گیرد. همچنین حفظ ساختار کلروفیل در شرایط تنش دمای پایین از طریق حفظ ثبات فتوسنتزی سبب بهره‌گیری بیشتر گیاه از نور شده و از طریق افزایش ذخایر کربوهیدراتی سبب ایجاد مقاومت گیاه به تنش سرما و درنتیجه افزایش درصد بقا در گیاهان می‌شود.

دامنه تغییرات آنتوسیانین از ۰/۲۲۴ (MLC33) تا ۰/۷۶۰ (MLC12) میلی‌مول بر گرم ماده تر متغیر بود (جدول ۲). حدود ۶۰ درصد ژنوتیپ‌ها از میزان آنتوسیانین کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برخوردار بودند (جدول ۲). آنتوسیانین جزء متابولیت‌های ثانویه است که نقش مهمی در تولید رنگ در گل‌ها، میوه‌ها و بافت رویشی گیاهان دارد و اثر آنتی اکسیدانی قویی دارد (Potapovich and Kostyuk, 2003).

بیوسنتز آنتوسیانین‌ها نه تنها در شرایط عادی بلکه به تنش‌های محیطی مانند نور، کاهش مواد مغذی و دمای پایین نیز انجام می‌شود. گزارش شده است که تنش سرما عامل مهمی در افزایش تولید آنتوسیانین بسیاری از گیاهان ازجمله کلزا است (*Brassica rapa*) (Ahmed *et al.,* 2015) و افزایش آن موجب بهبود تحمل به سرما در این گیاهان گردید. آنتوسیانین‌ها رنگیزه محافظ بوده که به‌وسیله حذف مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن در طول

جدول ۳- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های عدس در دمای ۱۳- درجه سانتیگراد (بالای قطر) و دمای ۱۵- درجه سانتیگراد (پایین قطر)

Table 3. Correlation coefficients between studied traits of lentil genotypes at -13 ºC (above diameter) and -15 ºC (below diameter)

ردیف NO.	Parameters	پارامتر	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Survival	بقا	1	-0.07	-0.03	0.09	-0.10	-0.11	0.01	-0.09	0.01	-0.17	-0.23*	0.12	-0.01	0.04	-0.21*	-0.08	-0.06
2	Dry weight	وزن خشک	-0.11	1	-0.15	-0.12	-0.25**	-0.06	-0.14	-0.14	-0.11	-0.07	0.18	-0.23*	-0.14	-0.22*	-0.09	-0.10	-0.10
3	Cha	کلرفیل a	0.14	-0.23*	1	0.50**	0.71**	0.66**	0.91**	0.12	0.29**	-0.06	0.08	0.23*	-0.03	0.18*	0.18*	0.04	0.08
4	Chb	کلرفیل b	0.24**	-0.20*	0.50**	1	0.15	-0.12	0.68**	0.07	0.26**	0.07	0.03	0.17	-0.14	0.35**	0.10	0.02	0.22*
5	Carotenoids	کاروتنوئید ها	0.01	-0.27**	0.71**	0.15	1	0.65**	0.61**	0.08	0.17	0.05	-0.03	0.17	0.13	0.13	0.14	0.10	0.04
6	Cha/b	نسبت کلروفیل a/b	0.01	-0.09	0.66**	-0.12	0.65**	1	0.55**	0.09	0.12	-0.07	0.10	0.09	0.09	-0.02	0.17	0.07	-0.02
7	Total pigments	رنگدانه کل	0.19*	-0.21*	0.91**	0.68**	0.61**	0.55**	1	0.16	0.31**	-0.01	0.11	0.29**	-0.06	0.25**	0.15	0.06	0.18*
8	Anthocyanin	آنتوسانین ها	0.03	0.03	0.12	0.07	0.08	0.09	0.16	1	0.13	-0.05	0.20*	0.01	0.09	0.12	-0.04	0.21*	0.09
9	DPPH	مهار رادیکال آزاد	0.10	-0.18*	0.29**	0.26**	0.17	0.12	0.31**	0.13	1	0.10	0.21*	0.47**	-0.02	0.17	0.14	0.01	-0.03
10	Protein	پروتئین	0.07	-0.08	-0.06	0.07	0.05	-0.07	-0.01	-0.05	0.10	1	0.11	-0.05	-0.01	0.02	-0.01	0.17	0.13
11	MDA	مالون دی آلدئید	-0.02	-0.04	0.08	0.03	-0.03	0.10	0.11	0.20*	0.21*	0.11	1	0.03	0.19*	0.18*	0.11	0.22*	0.11
12	Phenol	فنل	0.17	-0.07	0.23*	0.17	0.17	0.09	0.29**	0.01	0.47**	-0.05	0.03	1	-0.05	0.11	0.17	0.07	0.07
13	Flavonoids	فلاونوئید	-0.15	0.05	-0.03	-0.14	0.14	0.09	-0.06	0.09	-0.02	-0.01	0.19*	-0.05	1	0.01	-0.12	0.04	-0.03
14	Proline	پرولین	0.08	-0.10	0.18*	0.35**	0.13	-0.02	0.25**	0.12	0.17	0.02	0.18*	0.11	0.01	1	0.01	0.06	0.16
15	Soluble carbohydrates	کربوهیدرات های محلول	0.07	-0.29**	0.18*	0.10	0.14	0.17	0.15	-0.04	0.14	-0.01	0.11	0.17	-0.12	0.01	1	0.06	0.07
16	Ascorbate peroxidase	آسکوربات پراکسیداز	0.13	-0.21*	0.04	0.02	0.10	0.07	0.06	0.21*	0.01	0.17	0.22*	0.07	0.04	0.06	0.06	1	0.19*
17	Peroxidase	پراکسیداز	0.07	0.03	0.08	0.22*	0.04	-0.02	0.18*	0.09	-0.03	0.13	0.11	0.07	-0.03	0.16	0.07	0.19*	1

* and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۴- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه ژنوتیپ‌های عدس در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد

Table 4. Correlation coefficients between studied traits of lentil genotypes at -18 °C

ردیف NO.	Parameters	پارامتر	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Survival	بقا	1																
2	Dry weight	وزن خشک	0.77**	1															
3	Cha	کلرفیل a	0.07	0.03	1														
4	Chb	کلرفیل b	0.16	0.10	0.50**	1													
5	Carotenoids	کاروتنوئید ها	0.01	0.01	0.71**	0.15	1												
6	Cha/b	نسبت کلروفیل a/b	0.03	0.04	0.66**	-0.12	0.65**	1											
7	Total pigments	رنگدانه کل	0.11	0.09	0.91**	0.68**	0.61**	0.55**	1										
8	Anthocyanin	آنتوسانین ها	0.14	0.14	0.12	0.07	0.08	0.09	0.16	1									
9	DPPH	مهار رادیکال آزاد	0.13	0.01	0.29**	0.26**	0.17	0.12	0.31**	0.13	1								
10	Protein	پروتئین	-0.15	-0.07	-0.06	0.07	0.05	-0.07	-0.01	-0.05	0.10	1							
11	MDA	مالون دی آلدئید	-0.17	0.01	0.08	0.03	-0.03	0.10	0.11	0.20*	0.21*	0.11	1						
12	Phenol	فنل	0.07	0.04	0.23*	0.17	0.17	0.09	0.29**	0.01	0.47**	-0.05	0.03	1					
13	Flavonoids	فلاونوئید	-0.11	0.04	-0.03	-0.14	0.14	0.09	-0.06	0.09	-0.02	-0.01	0.19*	-0.05	1				
14	Proline	پرولین	0.12	0.31**	0.18*	0.35**	0.13	-0.02	0.25**	0.12	0.17	0.02	0.18*	0.11	0.01	1			
15	Soluble carbohydrates	کربوهیدرات های محلول	-0.13	-0.14	0.18*	0.10	0.14	0.17	0.15	-0.04	0.14	-0.01	0.11	0.17	-0.12	0.01	1		
16	Ascorbate peroxidase	آسکوربات پراکسیداز	0.11	0.26**	0.04	0.02	0.10	0.07	0.06	0.21*	0.01	0.17	0.22*	0.07	0.04	0.06	0.06	1	
17	Peroxidase	پراکسیداز	0.07	0.14	0.08	0.22*	0.04	-0.02	0.18*	0.09	-0.03	0.13	0.11	0.07	-0.03	0.16	0.07	0.19*	1

* and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

تنش اکسیداتیو از گیاه در برابر تنش محافظت می‌کنند (Zhang *et al.,* 2010).

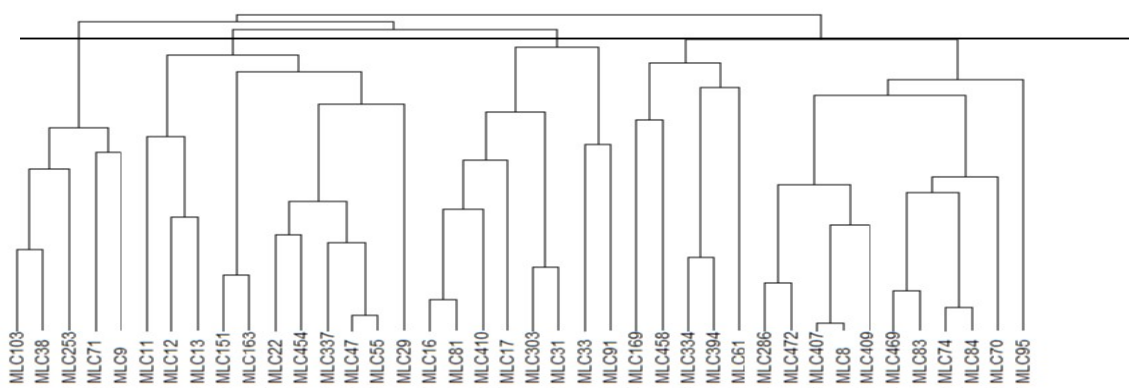
بررسی میزان محتوای کربوهیدرات‌های محلول در ۴۰ ژنوتیپ عدس موردمطالعه نشان داد که تنها ژنوتیپ MLC71 از محتوای کربوهیدرات‌های محلول کمتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برخوردار بود و تفاوت ۸۵ درصدی بین محتوای کربوهیدرات‌های محلول این ژنوتیپ با دو ژنوتیپ MLC91 و MLC303 که از بیشترین محتوای کربوهیدرات‌های محلول برخوردار بودند، مشاهده شد (جدول ۲).

رابطه مثبتی بین محتوای کربوهیدرات‌های محلول با محتوای کلروفیل مشاهده شد (جدول‌های ۳و ۴). به‌عبارتی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش یخزدگی از طریق حفظ ساختار کلروفیل و افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی سبب افزایش تولید محتوای کربوهیدرات‌های محلول در گیاه می‌شوند. تجمع کربوهیدرات‌های محلول به عنوان تنظیم کننده‌های اسمزی از طریق حفظ ساختار غشا از گیاه در برابر شرایط تنش یخزدگی محافظت کرده و سبب افزایش میزان تحمل گیاه در برابر تنش یخزدگی می‌شوند (Gusta and Wisniewski, 2013).

به‌طورکلی، کربوهیدرات‌های محلول از طریق کاهش دمای انجماد آب سلولی، کاهش پسابیدگی سلول‌ها در مقابل تشکیل یخ‌های بین سلولی و محافظت از ساختمان و نحوه عمل پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به سرما نقش عمده‌ای دارند (Atici and Nalbantoglu, 2003). هرچند در این آزمایش همبستگی مستقیمی بین تجمع کربوهیدرات‌های محلول و مقاومت به یخزدگی مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴) اما در بررسی تجزیه خوشه‌ای صفات موردمطالعه ژنوتیپ‌های گروه اول که ازنظر تحمل به یخزدگی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتر بودند، ازنظر مقدار کربوهیدرات‌های محلول از میانگین بالاتری برخوردار بودند (شکل ۲ و جدول ۵). به‌طورکلی از افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول می‌توان به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مناسب برای ارزیابی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما استفاده کرد.

نتایج نشان دهنده سنتز مقادیر متفاوت پرولین در شرایط خوسرمایی در بین ژنوتیپ‌های عدس موردمطالعه بود. تفاوت ۸۵ درصدی پ بین حداکثر و حداقل محتوای پرولین در ژنوتیپ‌های عدس مشاهده شد. در این میان ژنوتیپ‌های MLC458 و MLC469 با سنتز مقادیر بالای پرولین دارای اختلاف قابل توجهی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بودند (جدول ۲). تجمع پرولین نقش مهمی در ایجاد تحمل در گیاهان تحت شرایط تنش ایفا می‌کند (Awasthi *et al.,* 2015). افزایش مقدار پرولین در گیاهچه‌های لوبیا تحت تنش یخزدگی نیز گزارش شده است (Soliman *et al.,* 2018).

پرولین از طریق تنظیم اسمزی، حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و جلوگیری از



شکل ۲- گروه‌بندی خوشه‌ای ژنوتیپ‌های عدس بر اساس صفات موردمطالعه تحت شرایط کنترل‌شده

Fig. 2. Cluster grouping of lentil genotypes based on studied traits under controlled conditions

جدول ۵- میانگین و انحراف از میانگین برای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات موردمطالعه در ژنوتیپ‌های عدس تحت شرایط کنترل‌شده

Table 5. Mean and deviation from mean for groups in cluster analysis of traits in lentil genotypes under controlled conditions

			Group گروه									
			1		2		3		4		5	
	Genotypes (MLC)	ژنوتیپ	103, 38, 253, 71, 9		11, 12, 13, 151, 163, 22, 454, 337, 47, 55, 29		16, 81, 410, 17, 303, 31, 33, 91		169, 458, 334, 394, 61		286, 472, 407, 8, 409, 469, 83, 74, 84, 70, 95	
ردیف No.	Trait	صفت	میانگین گروه Group mean	انحراف از میانگین Deviation from mean	میانگین گروه Group mean	انحراف از میانگین Deviation from mean	میانگین گروه Group mean	انحراف از میانگین Deviation from mean	میانگین گروه Group mean	انحراف از میانگین Deviation from mean	میانگین گروه Group mean	انحراف از میانگین Deviation from mean
1	Survival (%)	درصد بقا	76.600	2.140	69.100	-5.350	72.900	-1.460	73.100	-1.360	80.500	6.060
2	Dry weight (mg plant^{-1})	وزن خشک (گرم در گیاه)	16.500	2.380	14.900	0.769	12.300	-1.830	14.600	0.484	13.400	-0.737
3	Cha (mg gfw^{-1})	کلرفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.397	-0.176	0.535	-0.038	0.625	0.050	0.570	-0.003	0.655	0.082
4	Chb (mg gfw^{-1})	کلرفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.303	-0.025	0.299	-0.028	0.328	-0.0003	0.327	-0.001	0.368	0.041
5	Carotenoids (mg gfw^{-1})	کاروتنوئید ها (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.113	-0.050	0.141	-0.023	0.188	0.024	0.175	0.011	0.185	0.022
6	Cha/b	نسبت کلروفیل a/b	1.360	-0.398	1.780	0.018	1.890	0.129	1.800	0.045	1.810	0.049
7	Total pigment (mg gfw^{-1})	رنگدانه کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.811	-0.258	0.999	-0.069	1.120	0.052	1.090	0.025	1.210	0.137
8	Anthocyanin (mmol gfw^{-1})	آنتوسانین ها (میلی مول بر گرم وزن تر)	0.382	-0.086	0.490	0.023	0.387	-0.081	0.569	0.101	0.497	0.029
9	DPPH (mg gfw^{-1})	مهار رادیکال آزاد (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.666	-0.152	0.764	-0.053	0.621	-0.196	0.965	0.148	1.020	0.198
10	Protein (mg gfw^{-1})	پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر)	13.400	2.350	9.49	-1.590	8.350	-2.730	17.300	6.220	10.800	-0.316
11	MDA (nmol gfw^{-1})	مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)	29.200	-13.700	50.200	7.300	32.500	-10.400	57.800	14.900	42.600	-0.264
12	Phenol (mg gfw^{-1})	فنل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	64.000	-6.920	64.900	-6.050	68.500	-2.440	84.400	13.400	75.800	4.880
13	Flavonoids (mg gfw^{-1})	فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.031	-0.0003	0.032	0.0002	0.031	-3.5E-05	0.032	7.83E-05	0.031	-2.9E-05
14	Proline (mg gfw^{-1})	پرولین (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.952	-0.301	1.020	-0.234	0.910	-0.343	1.720	0.465	1.660	0.409
15	Soluble carbohydrates (mg gfw^{-1})	کربوهیدرات محلول (میلی گرم بر گرم وزن تر)	0.578	-0.225	0.681	-0.122	1.030	0.228	1.010	0.202	0.770	-0.034
16	Ascorbate peroxidase (unit gfw^{-1})	آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر)	0.067	0.004	0.057	-0.007	0.055	-0.009	0.107	0.044	0.054	-0.009
17	Peroxidase (unit gfw^{-1})	پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر)	17.500	-2.200	18.500	-1.140	21.100	1.450	24.10	4.390	18.800	-0.907

تخریب آنزیم‌ها از گیاه در برابر تنش یخزدگی محافظت می‌کند. افزایش پرولین درنتیجه افزایش گاما-گلوتامین کیناز و کاهش فعالیت پرولین اکسیداز، سبب حفظ پتانسیل اسمزی لازم جهت حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی حیاتی در گیاه می‌شود (Khan *et al.,* 2013). همچنین تجمع پرولین به‌عنوان یک متابولیت ضروری در تحمل تنش در گندم نیز گزارش شده است (Apostolova *et al.,* 2008).

در این مطالعه، رابطه مثبت و معنی‌داری بین محتوای پرولین با کلروفیل‌های a و b و مالون‌دی‌آلدئید مشاهده شد. هرچند ارتباط معنی‌داری بین محتوای پرولین با درصد بقا مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴). در بررسی تجزیه خوشه‌ای صفات موردبررسی مقدار پرولین تنها در ژنوتیپ‌های گروه یک بیشتر از میانگین بود و ژنوتیپ‌های سایر گروه‌ها ازنظر پرولین از مقدار کمتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند (جدول ۵). ژنوتیپ‌های مقاوم از طریق حفظ ساختار کلروفیل و فعالیت تنظیم کننده‌های اسمزی نظیر پرولین (به‌عنوان جاروب کننده گونه‌های فعال اکسیژن) با تنش مقابله می‌کنند.

ازنظر غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در شرایط خوسرمایی بین ژنوتیپ‌های عدس موردمطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۶). تفاوت ۷۶ درصدی بین بیشترین (MLC151) و کمترین (MLC103) مقدار مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ‌های عدس موردمطالعه مشاهده شد (جدول ۷). از مالون‌دی‌آلدئید که از شکست ثانویه لیپید هیدروپراکسیدهای اولیه ناشی می‌شود، می‌توان به‌عنوان یک نشانگر جهت مشخص کردن مقدار خسارت ناشی از صدمات پراکسیدهایتولید شده حاصل از تنش استفاده کرد (Davey *et al.,* 2005). به‌عبارتی هرچه مقدار مالون‌دی‌آلدئید بالاتر باشد به معنای خسارت بیشتر به غشاهای سلولی است.

جدول ۶- تجزیه واریانس برای مالون‌دی‌آلدئید، فنل، فلاونوئیدها، پروتئین، مهار رادیکال آزاد DPPH، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 6. Analysis of variance for malondialdehyde (MDA), phenol, flavonoids, protein, DPPH, ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) in lentil genotypes before freezing stress under control conditions

منبع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	مالون‌دی‌آلدئید MDA	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoids	پروتئین Protein	مهار رادیکال آزاد DPPH	آسکوربات پراکسیداز APX	پراکسیداز POX
ژنوتیپ Genotype	39	775**	383*	0.001	165**	0.156**	0.003**	47.4**
خطا Error	80	100	219	0.00	3.76	0.029	0.00	17.4
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)	-	23.3	20.9	1.00	17.5	20.7	21.9	21.4

* and **: Significant at the 5%, and 1%, probability levels, respectively. * و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۷- مقایسه میانگین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، فنل، پروتئین، مهار فعالیت رادیکال آزاد (DPPH)، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 7. Mean comparison of MDA, phenol, protein, DPPH, ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) in lentil genotypes before freezing stress under controlled conditions

ژنوتیپ Genotype	مالون‌دی‌آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر) MDA (nmol gfw^{-1})	فنل (میلی گرم بر گرم وزن تر) Phenol (mg gfw^{-1})	پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر) Protein (mg gfw^{-1})	مهار رادیکال آزاد (میلی گرم بر گرم وزن تر) DPPH (mg gfw^{-1})	آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) APX (unit gfw^{-1})	پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تر) POX (unit gfw^{-1})
MLC8	33.6i-m	76.6a-e	3.98n-q	1.070b-d	0.027f-h	15.1f-h
MLC9	34.6i-m	63.6b-e	1.15q	0.807c-k	0.018gh	15.2f-h
MLC11	36.2h-m	56.7de	3.75o-q	0.513jk	0.151a	14.7gh
MLC12	61.5b-e	60.7c-e	2.76pq	0.855c-j	0.069b-g	22.2b-h
MLC13	55.1c-h	64.4b-e	5.79l-p	0.999b-f	0.061b-h	14.3h
MLC16	50.0c-j	67.7a-e	7.06j-o	0.556h-k	0.048e-h	29.9ab
MLC17	22.9lm	63.4b-e	5.77l-p	0.557h-k	0.036f-h	27.9a-c
MLC22	37.2h-m	67.1a-e	10.50f-j	0.700e-k	0.029f-h	18.5d-h
MLC29	47.7d-k	56.3de	11.90f-h	0.672f-k	0.036f-h	18.2d-h
MLC31	23.7lm	67.0a-e	12.00fg	0.532i-k	0.035f-h	14.1h
MLC33	23.0lm	59.5de	16.40de	0.734d-k	0.042f-h	15.2f-h
MLC38	25.3lm	54.3e	19.70cd	0.685f-k	0.062b-h	16.9d-h
MLC47	42.1e-l	64.0b-e	19.70cd	0.840c-k	0.045f-h	21.6c-h
MLC55	42.2e-l	73.9a-e	19.80cd	0.734d-k	0.062b-h	18.5d-h
MLC61	76.4ab	70.5a-e	41.20a	1.040b-e	0.115a-c	25.4a-d
MLC70	58.2c-f	82.3a-e	22.90bc	1.000b-f	0.058b-h	18.9d-h
MLC71	27.0lm	57.6de	24.90b	0.510k	0.078b-g	16.9d-h
MLC74	29.9k-m	68.8a-e	17.10de	0.883c-h	0.037f-h	18.3d-h
MLC81	31.5i-m	62.9c-e	6.32k-p	0.553h-k	0.063b-h	24.1a-e
MLC83	51.4c-i	63.0c-e	12.80f	0.890c-h	0.060b-h	19.7c-h
MLC84	39.9f-m	65.5a-e	11.00f-i	0.947b-f	0.053c-h	21.6c-h
MLC91	35.6h-m	61.7c-e	8.12h-m	0.917c-g	0.052c-h	16.5e-h
MLC95	29.6k-m	81.7a-e	11.70f-h	1.499a	0.050d-h	21.1c-h
MLC103	20.6m	82.6a-e	11.50f-h	0.742d-k	0.064b-g	18.9d-h
MLC151	85.5a	57.3de	9.15f-l	0.687f-k	0.053c-h	17.9d-h
MLC163	76.6ab	68.8a-e	6.43k-p	1.130bc	0.043f-h	16.4e-h
MLC169	62.8b-d	85.7a-d	16.10e	0.863c-i	0.083b-f	30.3a
MLC253	38.3g-m	61.9c-e	9.90f-k	0.587g-k	0.113a-d	19.5d-h
MLC286	54.9c-h	71.0a-e	8.25g-m	0.812c-k	0.118ab	19.2d-h
MLC303	42.0e-l	85.4a-d	5.51l-p	0.566h-k	0.084b-f	19.1d-h
MLC334	51.0c-j	85.7a-d	11.40f-h	1.07b-d	0.146a	23.2a-g
MLC337	36.6h-m	60.1de	8.32g-m	0.708e-k	0.075b-g	23.5a-f
MLC394	31.2j-m	94.7a	12.60f	1.070b-d	0.110a-e	21.9b-h
MLC407	47.8d-k	90.4a-c	8.66g-m	0.958b-f	0.048e-h	17.6d-h
MLC409	28.5k-m	93.2ab	7.64i-n	1.280ab	0.063b-h	21.4c-h
MLC410	31.5i-m	80.3a-e	5.69l-p	0.555h-k	0.077b-g	22.1b-h
MLC454	31.4i-m	84.5a-e	6.31k-p	0.575h-k	0.065b-g	18.2d-h
MLC458	67.5bc	85.2a-d	5.26m-p	0.782d-k	0.082b-g	19.5d-h
MLC469	38.1g-m	66.8a-e	7.23j-o	0.763d-k	0.039f-h	18.3d-h
MLC472	57.1c-g	74.8a-e	7.10j-o	1.070b-d	0.044f-h	15.2f-h

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

همبستگی منفی و معنی‌داری (r = -۰/۲۳*) بین درصد بقا و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در دمای ۱۳- درجه سانتی‌گراد وجود داشت (جدول‌های ۳ و ۴). وجود رابطه منفی بین مقاومت به سرما و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ‌های جو نیز گزارش شده است. به‌عبارتی ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما از کمترین مقدار این متابولیت برخوردارند (Valizadeh Kamran *et al.,* 2015). بررسی تجزیه رگرسیون گام به گام جهت پیش بینی صفات توجیه کننده درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس تحت تنش یخ‌زدگی نشان داد که مالون‌دی‌آلدئید یکی از عوامل موثر در درصد بقا در این مطالعه بوده و تأثیر منفی بر بقای ژنوتیپ‌های عدس داشته است (جدول ۸). بنابراین می‌توان عنوان کرد که مالون‌دی‌آلدئید یکی از صفات مهم در ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی در عدس می‌باشد.

جدول ۸- تجزیه رگرسیون گام به گام برای پیش بینی صفات توضیح دهنده درصد بقا در ژنوتیپ‌های عدس قبل از تنش یخ‌زدگی

Table 8. Stepwise regression analysis for prediction of traits explaining survival of lentil genotypes before freezing stress

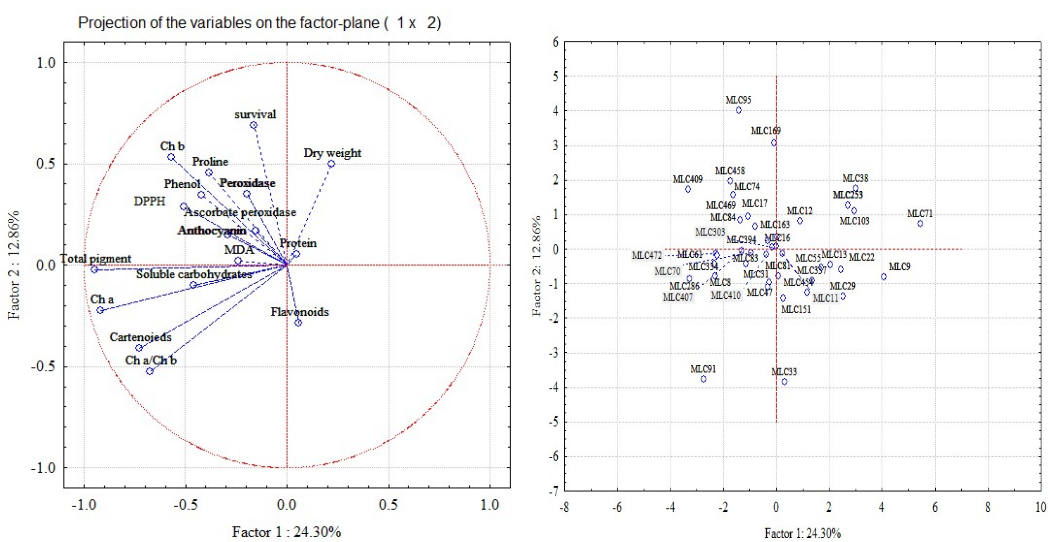
		Survival (%) درصد بقا		
Trait	صفات	ضریب Coefficient	بتای خطای استاندارد Standard error beta	سطح احتمال Probability level
Intercept	عرض از مبداء	-5.68	-	0.203
Shoot dry weight	وزن خشک شاخه	1.83	0.931	<0.0001
Chb	کلرفیل b	33.80	0.052	0.004
Protein contend	میزان پروتئین	-0.15	-0.029	0.107
MDA	مالون دی آلوئید	-0.09	-0.042	0.024
		$R^2 = 0.882$		$P < 0.001$

نتایج نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان فنل بود (جدول ۶). دامنه تغییرات میزان فنل از ۵۴/۳ در ژنوتیپ MLC38 تا ۹۴/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC394 متغیر بود (جدول ۷). هرچند نقش ترکیبات فنلی به‌عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی در حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش تحمل به تنش شناسایی شده است، اما در این بررسی همبستگی معنی‌داری بین میزان فنل و درصد بقا مشاهده نشد. اما وجود رابطه مثبت و معنی‌دار این صفت با رنگیزه‌های کل و ارتباط مثبت بین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه با تحمل تنش یخ‌زدگی (جدول‌های ۳ و ۴) می‌تواند نشان دهنده تأثیر مثبت این صفات فیزیولوژیکی در بهبود تحمل به تنش در ژنوتیپ‌ها باشد.

اگرچـه در ایـن مطالعـه تفـاوت معنـی‌داری بین ژنوتیپ از نظر میـزان فلاونوئیـد (جـدول ۶) و همچنـــین همبســـتگی معنـــی‌داری بـــین میزان فلاونوئید و میزان تحمل به تنش یخزدگی مشـــاهده نشـــد (جـــدول‌های ۳ و ۴)، امـــا نقـــش فلاونوئیـــدها بـــه‌عنوان اصـــلی‌ترین و پیچیـــده‌ترین زیـــر گـــروه پلـــی فنل‌هـــا در مهـار پراکسیداسـیون لیپیـد در شـرایط تـنش توسـط سـایر محققـان نیـز گـزارش شـده اسـت (Di Ferdinando *et al.*, 2012).

ازنظر میزان پروتئین محلول بـین ژنوتیپ‌هـای موردمطالعه عدس در شرایط خوسرما شـده قبـل از اعمـال تـنش یخزدگـی تفـاوت معنـی‌داری مشاهده شد (جدول ۶). محتـوای پـروتئین بـرگ در ژنوتیپ‌های عدس از دامنـه تنـوع گسـترده‌ای از ۱/۱۵ (MLC9) تا ۴۱/۲ (MLC61) میلی‌گـرم در گرم بین بیشـترین و کمتـرین مقـدار پـروتئین متغیر بود (جـدول ۷). امـا همبسـتگی معنـی‌داری بین مقدار پـروتئین بـا سـایر صـفات انـدازه‌گیری شده قبل از یخ زدگی و همچنین با درصـد بقـا و وزن خشک مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴).

تجزیه رگرسیون گام به گام جهت پیش بینـی صفات توضیح دهنده درصـد بقـا در ژنوتیپ‌هـای عـدس قبـل از تـنش یخزدگـی نیـز نشـان داد کـه میـزان پـروتئین محلـول اثـر منفـی معنـی‌داری بـر درصد بقا در ژنوتیپ‌های عـدس داشـت (جـدول ۸). بررسی آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشـان داد کـه پـروتئین محلـول در هـیچ یـک از دو بُعـد مـــوثر در بقـــای ژنوتیپ‌هـــا قـــرار نگرفـــت و ژنوتیپ‌های موجود در بخش پـروتئین محلـول در نمودار بای‌پلات نیز در گروه متحمل به یخزدگـی تجزیه خوشه‌ای قرار نگرفتند (شکل ۲ و ۳).



شکل ۳– بای‌پلات بر مبنای دو مؤلفهٔ اصلی اول و دوم برای ژنوتیپ های عدس

Fig. 3. Biplot based on two main principal components for lentil genotypes

نتـایج نشـان دهنـده تفـاوت معنـی‌دار بـین ژنوتیپ‌هـای عـدس ازنظـر میـزان فعالیـت مهـار رایکـال آزاد (DPPH) بـود (جـدول ۶). دامنـه محتـوای ایـن صـفت از ۰/۵۱۰ در ژنوتیـپ MLC71 تا ۱/۴۹۹ میلی‌گرم در گرم ماده تـر در ژنوتیپ MLC95 متغیر بـود (جـدول ۷). ارتبـاط مثبت و معنی‌داری بین این صـفت بـا درصـد بقـا گیاهچه‌های عدس در دماهای یخ‌زدگی مشـاهده نشد. تنهـا در دمـای ۱۵- درجـه سـانتی‌گراد بـین ایـن صـفت بـا وزن خشـک نهـایی گیاهچـه‌ها ارتباط منفی و معنی‌داری وجود داشت. همچنـین این صـفت بـا غلظـت کلروفیـل a، کلروفیـل b و کل رنگ‌دانه‌های فتوسـنتزی همبسـتگی مثبـت و معنی‌داری نشان داد (جدول‌های ۳ و ۴).

بررسـی میـانگین و انحـراف از میـانگین گروه‌هـای حاصـل از تجزیـه خوشـه‌ای بـرای صفات موردمطالعه در ژنوتیپ‌های عـدس نشـان داد که ژنوتیپ‌های گروه پـنجم بـا درصـد بقـای بـالاتر از میـانگین فعالیـت مهـار رایکـال آزاد (DPPH) بیشـتری نسـبت بـه سـایر گروه‌هـا برخوردار می‌باشند (شکل ۲ و جدول ۵). آزمـون تجزیـه بـه مؤلفـه‌های اصـلی نیـز نشـان داد کـه فعالیت مهار رایکـال آزاد (DPPH) در بعُـد دوم قـرار گرفـت و عمـده ژنوتیپ‌هـای ایـن بعُـد در گروه متحمل بـه یخ‌زدگـی قـرار گرفتنـد (شـکل ۳). بـه‌طور کلـی فعالیـت مهـار رادیکـال آزاد (DPPH) می‌توانـد بـه عنـوان یـک سـامانه آنتی‌اکسیدانی نقـش مهمـی را در مقابلـه گیـاه بـا تنش یخ‌زدگی ایفا کند.

نتـایج حاصـل از تجزیـه واریـانس آنزیم‌هـای آنتی اکسیدانتی شامل آسـکوربات پراکسـیداز و پراکسیداز حاکی از تفاوت معنی‌دار این صـفات در ژنوتیپ‌های مختلف عـدس بـود (جـدول ۶). نتایج به ترتیب نشان دهنده تفاوت هشت برابـری بـین بیشـترین (MLC334) و کمتـرین (MLC9) مقـدار آسـکوربات پراکسـیداز و تفـاوت دو برابـری در بیشـترین (MLC169) و کمتـرین (MLC31) مقدار پراکسیداز بود (جـدول ۷). در میان ژنوتیپ‌های عـدس موردمطالعـه ۳۸ درصـد آنهـا از مقـدار آسـکوربات پراکسـیداز کمتـر از ۰/۰۵ واحد در گـرم وزن تـر برخـوردار بودنـد و محتوای آنزیم پراکسیداز چهـار درصـد کمتـر از مقدار میانگین بـود (جـدول ۷). ایـن نتـایج تاییـد کننده وجود رابطه مثبـت بـین مقـدار آنزیم‌هـای آنتـی اکسـیدانتی آسـکوربات پراکسـیداز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌هـای موردمطالعـه می‌باشـد (جدول‌های ۳ و ۴).

بررسـی آزمـون تجزیـه بـه مؤلفـه‌های اصـلی نشـان داد کـه آنزیم‌هـای آنتـی اکسـیدانتی آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در بُعـد دوم نمودار بای‌پلات قرار گرفتند و بـر اساس تجزیـه خوشه‌ای ژنوتیپ‌هـای گـروه پـنجم کـه متحمـل بـه تـنش یخ‌زدگـی بودنـد نیـز عمـدتاً در ایـن بُعـد قـرار گرفتنـد (شـکل ۲ و ۳). فعالیـت آسـکوربات پراکسـیداز بـه‌عنوان قسـمتی از سـامانه آنتـی اکسـیدانی، سـلول را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظـت کـرده و از تجمـع پراکسـیدهیدروژن ممانعـت می‌کنـد

(Gill and Tuteja, 2010).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز باعث شکسته شدن پراکسیدهیدروژن به آب و مولکول اکسیژن شده و به‌عبارتی پراکسید هیدروژن تولیدشده را از طریق چرخه آسکوربات- گلوتاتیون سم‌زدایی می‌کند و مانند یک پیام‌رسان مولکولی می‌توانند تجمع پراکسیدهیدروژن را تنظیم کنند (Muthuramalingam *et al.,* 2013). نقش این آنزیم در افزایش تحمل به تنش یخ‌زدگی در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گزارش شده است (Soliman *et al.,* 2018).

تجزیه واریانس داده ها برای درصد بقا و وزن خشک شاخ و برگ نشان داد که اثر ژنوتیپ، دما و اثر متقابل آنها معنی دار بود (جدول ۹). ارزیابی خسارت از طریق اندازه‌گیری درصد بقا پس از قرار گرفتن آن در معرض دماهای یخ‌زدگی و همچنین ارتباط احتمالی آن با سایر صفات قبل از بروز تنش سرما، به‌عنوان شاخصی برای انتخاب گیاهان متحمل به تنش مورداستفاده قرار می‌گیرد. مقایسه میانگین حاصل از اثر تنش یخ‌زدگی نشان داد که ۴۰ درصد (۱۶ ژنوتیپ) از ژنوتیپ‌ها از بقای بیش از ۸۰ درصد برخوردار بودند (جدول ۱۰).

از میان این ژنوتیپ‌ها، شش ژنوتیپ (MLC8، MLC74، MLC84، MLC95، MLC409 و MLC472) براساس تجزیه خوشه‌ای در گروه پنجم قرار گرفتند که از درصد بقای بالاتری نسبت به سایر گروه ها نیز برخوردار بودند (جدول ۵). همچنین ۱۰ ژنوتیپ از میان ژنوتیپ‌های دارای بقای بالای ۸۰ درصد از ظرفیت آنتی اکسیدانی و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی مطلوبی نیز براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای برخوردار بودند که این نتایج تایید کننده رابطه مستقیم بین درصد بقا با صفات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی گیاه می‌باشد (جدول ۵ و شکل ۲).

جدول ۹- تجزیه واریانس برای درصد بقا و وزن خشک شاخه و برگ ژنوتیپ‌های عدس پس از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 9. Analysis of variance for survival percentage and shoot dry weight of lentil genotypes after freezing stress under controlled conditions

S.O.V.	منبع تغییر	درجه آزادی df	درصد بقا Survival (%)	وزن خشک شاخه Shoot dry weight
Genotype (G)	ژنوتیپ	39	94771**	135.0**
Temperature (T)	دما	2	1483**	2965.0**
G ×T	ژنوتیپ× دما	78	945**	110.0**
Error	خطا	240	475	14.8
C.V. (%)	درصد ضریب تغییرات	-	29.3	25.3

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

**: Significant at the 1% of probability level.

جدول ۱۰- درصد بقا و وزن خشک شاخ و برگ ژنوتیپ‌های عدس پس از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 10. Survival percentage and shoot dry weight of lentil genotypes after freezing stress under controlled conditions

ژنوتیپ Genotype	درصد بقا Survival (%)	وزن خشک شاخه (میلی گرم بر گیاه) Shoot dry weight ($mg.plant^{-1}$)
MLC8	83.3b-d	11.3k-m
MLC9	50.0hi	16.9e-g
MLC11	94.4ab	19.7cd
MLC12	100.0a	24.2b
MLC13	66.7e-g	19.0c-e
MLC16	66.7e-g	15.7gh
MLC17	100.0a	16.2f-h
MLC22	62.5f-h	16.3f-h
MLC29	58.3g-i	8.48no
MLC31	66.7e-g	15.7gh
MLC33	66.7e-g	13.0i-k
MLC38	96.7ab	10.1c-e
MLC47	73.6d-f	12.6jk
MLC55	66.7e-g	13.1i-k
MLC61	59.7f-h	14.1h-j
MLC70	66.7e-g	10.9k-n
MLC71	66.7e-g	12.5jk
MLC74	91.7a-c	24.2b
MLC81	66.7e-g	9.85l-n
MLC83	52.8g-i	15.5g-i
MLC84	91.7a-c	14.1h-j
MLC91	44.4i	6.17o
MLC95	100.0a	15.5g-i
MLC103	83.3b-d	11.8j-l
MLC151	54.2g-i	14.1h-j
MLC163	66.7e-g	14.2h-j
MLC169	88.9a-c	24.4b
MLC253	86.1a-d	28.2a
MLC286	73.3d-f	12.8jk
MLC303	80.0c-e	12.3j-l
MLC334	58.3g-i	8.57no
MLC337	58.3g-i	18.3d-f
MLC394	66.7e-g	9.2mn
MLC407	79.2c-e	11.2k-m
MLC409	96.7ab	15.8f-h
MLC410	92.5a-c	17.4d-g
MLC454	58.3g-i	16.9e-g
MLC458	91.7a-c	21.4c
MLC469	66.7e-g	12.0j-l
MLC472	83.3b-d	14.2h-j

میانگین‌هایی،در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند برا ساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

تنها پنج ژنوتیپ توانستند ماده خشک بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر گیاه تولید کنند (جدول ۱۰). هرچند در برخی مطالعات اندازه‌گیری صفات مربوط به رشد مجدد گیاه نظیر وزن خشک به عنوان شاخصی برای تعیین میزان تحمل گیاهان به تنش مورداستفاده قرار می‌گیرد، اما در این بررسی اگرچه بر اساس تجزیه گام به گام رابطه بین وزن خشک و درصد بقای گیاهان مثبت بود (جدول ۸). اما براساس نتایج حاصل از نمودار بای پلات وزن خشک نهایی گیاه در هیچ یک از دو بُعد موثر بر ظرفیت آنتی اکسیدانی و رنگیزه‌ای ژنوتیپ‌ها قرار نگرفت (شکل ۳).

تجزیه رگرسیونی گام به گام با وارد کردن کلیه صفات اندازه‌گیری شده به مدل رگرسیونی انجام گردید و صفاتی که بیشترین اثر معنی‌دار بر درصد بقا داشتند، مشخص شدند (جدول ۸). در این میان وزن خشک بوته و غلظت کلروفیل b اثر مثبت و معنی‌دار و مالون‌دی‌آلدئید تأثیر منفی معنی‌دار بر روی درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس داشتند (جدول ۸). بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها در پنج گروه مجزا از هم تفکیک شدند. به ترتیب ۵، ۱۱، ۸، ۵ و ۱۱ ژنوتیپ، در گروه‌های اول تا پنجم قرار گرفتند (شکل ۲). مقایسه میانگین گروه‌ها با میانگین کل نشان داد که درصد بقا در گروه‌های اول و پنجم نسبت به میانگین کل برتری داشت و در سایر گروه‌ها پایین‌تر از میانگین کل بود. به‌طور کلی نتایج نشان دهنده برتری نسبی ژنوتیپ های گروه چهارم در اکثر صفات موردمطالعه (به جز در مورد درصد بقا، کلروفیل a و کلروفیل b) نسبت به میانگین کل بود (جدول ۵). بعد از گروه چهارم نیز، ژنوتیپ‌های متعلق به گروه پنجم از بیشترین برتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند. این نتایج نشان دهنده مناسب‌تر بودن این ژنوتیپ‌ها جهت استفاده از صفات برتر آن‌ها برای تحمل به سرمای زمستان در برنامه های به‌نژادی عدس می‌باشد.

آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و ترسیم بای‌پلات نشان داد که مولفه اول ۲۴/۳۰ درصد از تغییرات صفات شامل صفات کلروفیل a، کاروتنوئیدها، نسبت کلروفیل a/b، غلظت کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات‌های محلول را شامل شد. مولفه دوم صفات مالون‌دی‌آلدئید، آنتوسیانین، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، مهار رادیکال آزاد DPPH، پرولین، فنل کل، کلروفیل b و درصد بقا را با ۱۲/۸۶ درصد توضیح داد (شکل ۳). در واقع این بُعد از نمودار ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و متابولیتی را دربر دارد. بنابراین ژنوتیپ‌هایی که دارای PCA1 پایین‌تری هستند ازنظر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌ها وضعیت مناسب‌تری دارند.

ژنوتیپ‌های MLC469، MLC458، MLC409، MLC74، MLC84، MLC169، MLC394، MLC95، MLC17، MLC163 و MLC303 ازنظر ظرفیت آنتی اکسیدانی و متابولیت‌ها نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از وضعیت

مناسب‌تری برخوردار بودند. از طرف دیگر ژنوتیپ‌های MLC70، MLC410، MLC47، MLC31، MLC91، MLC8، MLC286، MLC407 و MLC472، MLC61، MLC83 و MLC334 ازنظر ظرفیت رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی از وضعیت مطلوبی داشتند (شکل ۳).

بررسی آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی همراه با نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکثر ژنوتیپ‌های موجود در بُعد اول و دوم در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در گروه های چهارم و پنجم در تجزیه خوشه‌ای قرار دارند. با توجه به این نتایج ممکن است استنباط شود که ژنوتیپ‌های عدس که قادر به حفظ بقای خود در شرایط تنش یخ‌زدگی بودند از سازکار فعالیت آنتی اکسیدانی و غلظت متابولیت‌ها و همچنین رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی بالاتری برخوردار بودند. بنابراین این ویژگی‌ها می‌توانند در گزینش بهتر ژنوتیپ‌های متحمل به یخ‌زدگی عدس موثر باشند.

نتایج این پژوهش نشان دهنده تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه از لحاظ صفات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. همبستگی مناسبی بین محتوای کلروفیل b، پروتئین محلول و مالون‌دی‌آلدئید با درصد بقا در مقایسه سایر صفات آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. نتایج خوشه‌بندی و مقایسه میانگین گروه‌ها نیز نشان دهنده تحمل به سرمای مناسب‌تر در ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول و پنجم بود. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به یخ‌زدگی در دو بُعد نمودار بای‌پلات قرار گرفتند که بیشترین میزان تغییرات را توضیح دادند.

به طور کلی ژنوتیپ‌های متحمل به دو گروه تقسیم شدند که یک گروه ازنظر رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی پتانسیل بالاتری داشتند و گروه دیگر ازنظر متابولیت‌ها و ترکیب‌های آنتی اکسیدانتی سازکار موفق‌تری دارا بودند. بنابراین براساس نتایج حاصل از این پژوهش به‌نظر می‌رسد که این شاخص‌ها قبل از اعمال تنش سرما اهمیت بیشتری در پیش‌بینی تأثیر سرما بر درصد بقا ژنوتیپ‌های عدس دارند.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این پژوهش از محل طرح پژوهشی مصوب با کد ۴۸۰۲۱ در معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تأمین‌شده است که بدین‌وسیله سپاسگزاری می شود.

References

Abe, N., Murata, T., and Hirota, A. 1998. Novel 1,1-diphenyl-2-picryhy- drazyl-radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. Bioscience, Biotechnology, Biochemistry 62 (4): 61-662.

Ahmed, N. U., Park, J. I., Jung, H. J., Hur, Y., and Nou, I. S. 2015. Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. Functional and Integrative Genomics 15 (4): 383-394.

Apostolova, P., Yordanova, R., and Popova, L. 2008. Response of antioxidative defense system to low temperature stress in two wheat cultivars. General and Applied Plant Physiology 34 (3-4): 281-294.

Atici, O., and Nalbantoglu, B. 2003. Antifreeze proteins in higher plants. Phytochemistry 64: 1187-1196.

Awasthi, R., Bhandari, K., and Nayyar, H. 2015. Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. Frontiers in Environmental Science 3 (11): 1-24.

Bagheri, A. R. Nezami, A., and Hojjat, S. S. 2004. Evaluation of cold tolerance in lentil for fall planting in the highlands of Iran. Final report of research project. Ferdowsi University of Mashhad. (in Persian). 187 pp.

Balamurugan, S., Ann, J. S., Varghese, I. P., Murugan. Sh. M., Harish, M. Ch., Kumar, S. R., and Sathishkumar, R. 2018. Heterologous expression of *Lolium perenne* antifreeze protein confers chilling tolerance in tomato. Journal of Integrative Agriculture 17 (5): 1128–1136.

Barrios, A., Aparicio, T., J. Rodriguez, M., Perez de la Vega, M., and Caminero, C. 2016. Winter sowing of adapted lines as a potential yield increase strategy in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Spanish Journal of Agricultural Research 14 (2): 1-8.

Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39 (1): 205-207.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1-2): 248-254.

Caverzan, A., Casassola, A., and Patusssi Brammer, S. 2016. Antioxidant responses of wheat plants under stress. Genetics and Molecular Biology 39 (1): 1-6.

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal

of Food and Drug Analysis 10 (3): 178-182

Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J., and Swennen, R. I. 2005. High throughput of malondialdehyde in plant. Analytical Biochemistry 347: 201-207.

Dere, S., Gines, T., and Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Journal of Botany 22 (1): 13-17.

Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., and Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in Plants under abiotic stresses. pp. 159–179. In: Ahmad, P., Prasad, M. N. V. (Eds.) Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Springer, New York.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. Nature 168 (4265): 167-167.

Duman, J. G., and Wisniewski, M. J. 2014. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. Environmental and Experimental Botany 106: 60–69.

FAO. 2017. Crop production statistics. Food and Agriculture Organization of United National, Rome, Italy (http://www.fao.org/faostat).

Gholami Rezvani, N., Nezami, A., Kafi, M., and Nabati, J. 2019. Evaluation of lentil (*Lens culinaris*) genotypes for autumn sowing in cold temperate regions under field conditions. Journal of Plant Production 11 (4): 142-147. (in Persian)

Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Gusta, L. V., and Wisniewski, M. 2013. Understanding plant cold hardiness: an opinion. Physiologia Planarum 147: 4–14.

Heath, R. L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125 (1): 189-198.

Hincha, D. K., and Zuther, E. 2020. Introduction: plant cold acclimation and winter survival. Methods in Molecular Biology 2156: 1-7.

Hojjat, S. S., and Galstyan, M. H. 2014. Study of economic-ecological results of cold

resistance sort of the Lentil world collection under highlands of Islamic Republic of Iran. International Journal of Agriculture and Crop Science 7 (14): 1364-1370.

Hojjat, S. S., Bagheri, A. R., and Nezami, A. 2007. Evaluation of lentil germplasm for cold tolerance for fall planting in highlands of Iran. Journal of Agriculture Science 1: 19-31.

Homer, A., Sahin, M., and Kucukozdemir, U. 2016. Evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for winter hardiness in central Anatolia, Turkey, using field and controlled environment. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 52 (2): 55–63.

Janmohammadi, M., Enayati, V., and Sabaghnia, N. 2012. Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat. Icelandic Agricultural Sciences 25: 3-11.

Johnson, G. N. 2005. Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact? Journal of Experimental Botany 56: 407–416.

Khan, M. I., Iqbal, N., Masood, A., Per, T. S., and Khan, N. A. 2013. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. Plant Signaling and Behavior 8 (11), e26374, DOI: 10. 4161/psb26374.

Kim, S., Lee, S., and Lee, I. 2012. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. Water, Air, and Soil Pollution 223: 2799-2806.

Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., Zhao, Y., and Chai, Z. 2010. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. Chemosphere 78: 273-279.

Miura, K., and Furumoto, T. 2013. Cold signaling and cold response in plants. International Journal of Molecular Science 14 (3): 5312–5337.

Muthuramalingam, M., Matros, A., Scheibe, R., Mock, H. P., and Dietz, K. J. 2013. The hydrogen peroxide-sensitive proteome of the chloroplast in vitro and in vivo. Frontiers in Plant Science 4: 54.

Oakley, C. G., Savage, L., Lotz, S., Larson, G. R., Thomashow, M. F., Kramer, D. M., and Schemske, D. W. 2018. Genetic basis of photosynthetic responses to cold in two locally adapted populations of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 69: 699–709.

Paredes, M., and Quiles, M. J., 2015. The effects of cold stress on photosynthesis in Hibiscus plants. PLoS One 10 (9): e0137472, DOI: 10.1371/journal. Pone. 0137472.

Potapovich, A. I., and Kostyuk, V. A. 2003. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. Biochemistry (Moscow) 68 (5): 514–519.

Pradedova, E. V., Isheeva, O., and Salyaev, R. 2011. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. Russian Journal of Plant Physiology 58: 210-217.

Rahaie, M., Xue, G. P., and Schenk, P. M. 2013. The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. pp. 367-385. In: Vahdati, K., and Leslie, C. (eds.) Abiotic stress - plant responses and applications in agriculture. InTech, Rijeka, Croatia.

Saibo, N. J. M., Lourenço, T., and Oliveira, M. M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Annals of Botany 103: 609–623.

Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., R. Fernie, A., and K. Hincha, D. 2016. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana.* Scientific Reports: 1-10.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany: 1-26.

Singleton, V. L., and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16 (3): 144-158.

Soliman, M. H., Alayafi, A. A. M., El Kelish, A. A., and Abu-Elsaoud, A. 2018.

Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. Botanical Studies 59: 6.

Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H., Shekar-Shetty, H., Savithri, H., and Sudhakar, C. 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. Plant Science 141 (1): 1-9.

Thavarajah, D. 2017. Lentils (*Lens culinaris* L.): Linking whole foods for better human health. Nova Sciences Publishers. 229 pp.

Valizadeh Kamran, R., Toorchi, M., Moghadam, M., and Mohammadi, H. 2015. The effect of cold stress on H2O2 and MDA contents in barely genotypes. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 7 (3): 66-75.

Vitmas, P., Kosova, K., and Musilova, J. 2019. Relationship between dehydrin accumulation and winter survival in winter wheat and barley grown in the field. Frontiers in Plant Science 10: 7. DOI: 10.338q/fpls.2019.0007.

Wanger, G. J. 1979. Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin's in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.

Winfield, M. O., Lu, C, Wilson, L. D., Coghill, J. A., and Edwards, K. J. 2010. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. Plant Biotechnology Journal 8: 749-771.

Wisniewski, M., Glenn, D. M., and Fuller, M. P. 2002. Use of a hydrophobic particle film as a barrier to extrinsic ice nucleation in tomato plants. Journal of the American Society for Horticultural Science 127 (3): 358-364.

Yamaguchi, K., Mori, H., and Nishimura, M. 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. Plant & Cell Physiology 36 (6): 1157-62.

Zhang, K. M., Yu, H. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q., and Xia, X. J. 2010. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. Plant Science 179 (3), 202-208.